

CHAPITRE II. Mutations, mutagenèse et détection

1. INTRODUCTION

La biodiversité se définit à différents niveaux l'un d'eux correspond à la diversité des allèles (versions des gènes créées par mutations) au sein des individus d'une même espèce, chaque individu étant génétiquement différent des autres individus de l'espèce, à de rares exceptions près.

Elle permet ainsi aux espèces de s'adapter à un environnement constamment changeant, de résister aux parasites et aux nouvelles maladies. Les réparations de la molécule d'ADN sont permanentes, mais pas infaillibles.

L'incidence de la non-réparation de la molécule donne des cancers (dans le cas des cellules du corps, cellules somatiques) ou peu, si les mutations touchent les cellules germinales aboutir à une destruction totale des espèces.

Les mutations génétiques sont des changements dans la séquence de base de l'ADN d'un organisme. Elles résultent d'erreurs de copie de l'ADN ou d'une exposition à des conditions environnementales, comme des rayonnements UV ou des produits chimiques nocifs.

Une mutation est une modification de l'information génétique contenue dans l'ADN. Elle affecte la séquence par le remplacement d'un ou plusieurs nucléotides, l'insertion ou la délétion de quelques nucléotides. Elle peut être due à l'instabilité du génome, à des erreurs de copie ou de réparation lors de la multiplication des cellules ou de la reproduction sexuée, à des coupures de l'ADN, à des conditions environnementales ou à l'action ciblée du sélectionneur.

Les mutations sont la source de la variabilité dans une même espèce, il existe 2 sources importantes de mutations :

- Des erreurs de réplication de la molécule d'ADN
- Des lésions chimiques du matériel génétique pendant ou en dehors de la réplication

2. Les mutations au cours de la réplication

Les 3 mécanismes de mutations peuvent affecter l'ADN au cours de la réplication :

- **Des substitutions** : Il s'agit du changement d'une paire de base en une autre :
 - **Mutation par transition** : correspond au remplacement d'une base purique par une autre base purique ou une base pyrimidique par une autre base pyrimidique.
 - **Mutation par transversion** : correspond au remplacement d'une base purique par une pyrimidique ou d'une pyrimidine par une purine.
- **Délétion** : perte d'un ou plusieurs nucléotides.
- **Addition** : l'insertion d'un ou plusieurs nucléotides

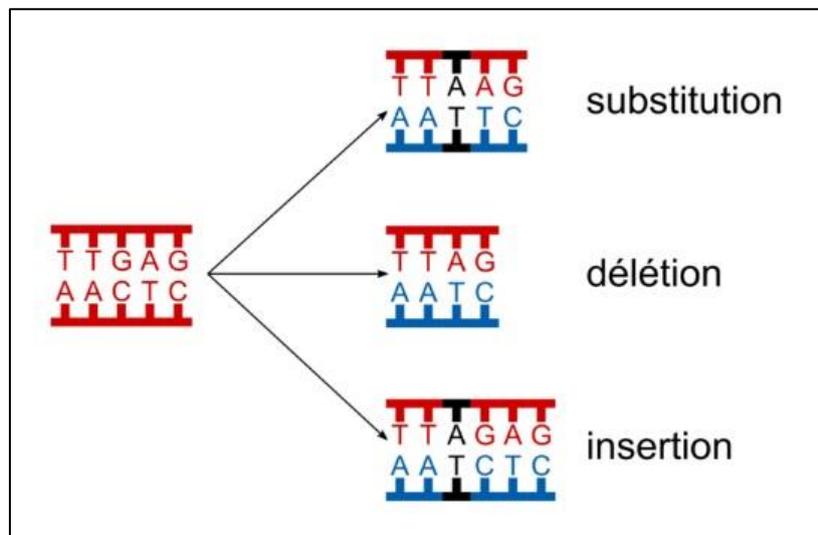


Figure 1. Les mutations au cours de la réplication

3. Mutagénèse

- La mutagénèse, ou mutagenèse, est le processus d'apparition d'une mutation. Il peut être naturel ou artificiel (par exposition de l'ADN à un « agent mutagène »).
- La mutagénèse est aussi une technique essentielle pour l'étude de gènes spécifiques. Elle permet de d'obtenir une multitude d'informations dont le rôle et la fonction d'un gène.
- L'observation des mutants est une des méthodologies de bases de la génétique. Cependant, la fréquence d'apparition de mutants dans une population d'organismes est relativement basse, la probabilité d'obtenir de manière naturelle un mutant pour une fonction ou un processus biologique particulier est donc particulièrement faible. Pour augmenter cette probabilité, les organismes sont traités par un agent mutagène, puis les mutants obtenus sont sélectionnés en fonction d'un crible⁸
- Deux méthodes sont possibles, la mutagénèse aléatoire et la mutagénèse dirigée. La première consiste à utiliser un agent mutagène, qui induira de manière aléatoire des mutations dans le génome de l'organisme étudié. L'endroit et la nature des mutations ne sont pas prévisibles et ne peuvent pas être contrôlés. La seconde utilisera des méthodes de biologie moléculaire pour induire une mutation précise dans le gène ciblé.

3.1 La mutagénèse dirigée

est aussi une approche utilisée par le génie génétique et la biologie pour comprendre la fonction des gènes ; elle consiste en l'introduction volontaire de mutations par l'action d'agents mutagènes chimiques ou physiques dans une séquence ADN⁴ afin de déduire des informations sur le rôle des gènes, à partir de l'analyse des effets de ces mutations. La modification in vitro de la séquence en acides aminés d'une protéine permet d'évaluer l'importance de ces acides aminés dans la fonction de la protéine. Le but est donc de muter le gène et de produire la protéine⁵. Cette technique est aussi utilisée en production de variétés nouvelles⁶.

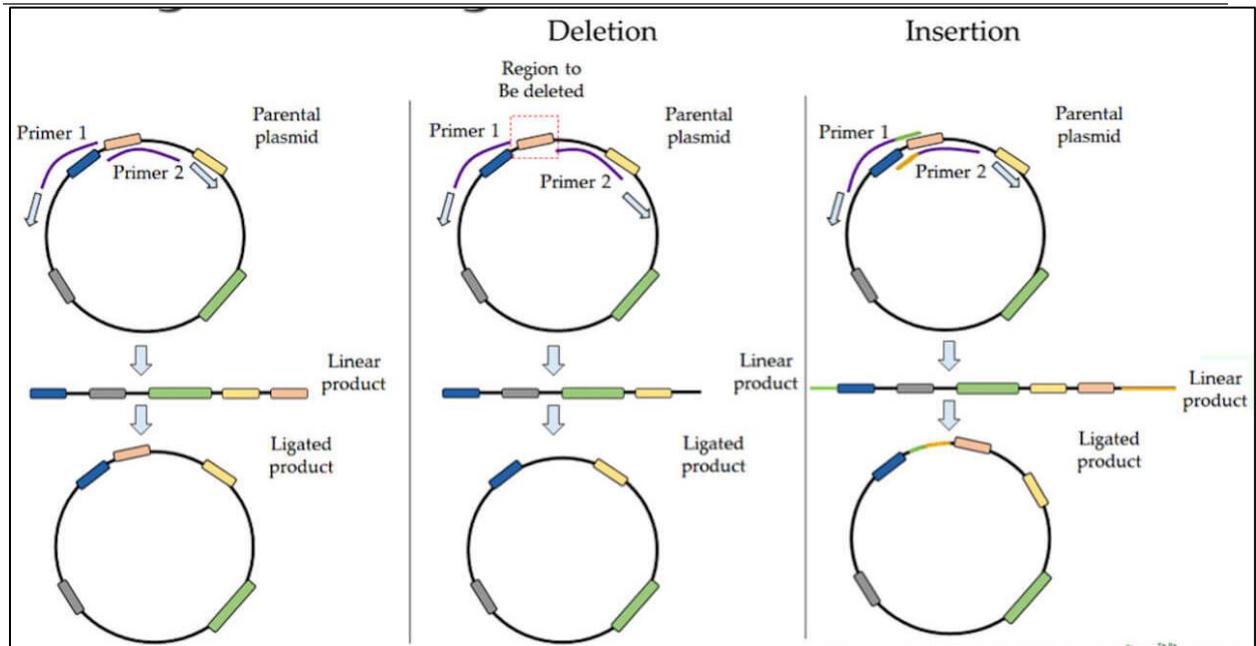


Figure 2. Mutagenèse Dirigée

3.2. La mutagenèse aléatoire.

Elle consiste à exposer des cellules végétales à des agents énergétiques (rayons gamma, rayons X...) ou chimiques afin de les faire muter. Ainsi que l'induction d'une mutation par l'action d'un agent mutagène. Elle est la génération de mutations dans le matériel génétique des êtres vivants. La mutagenèse est utilisée en recherche biologique et médicale ainsi que dans la sélection afin d'obtenir les propriétés souhaitées.

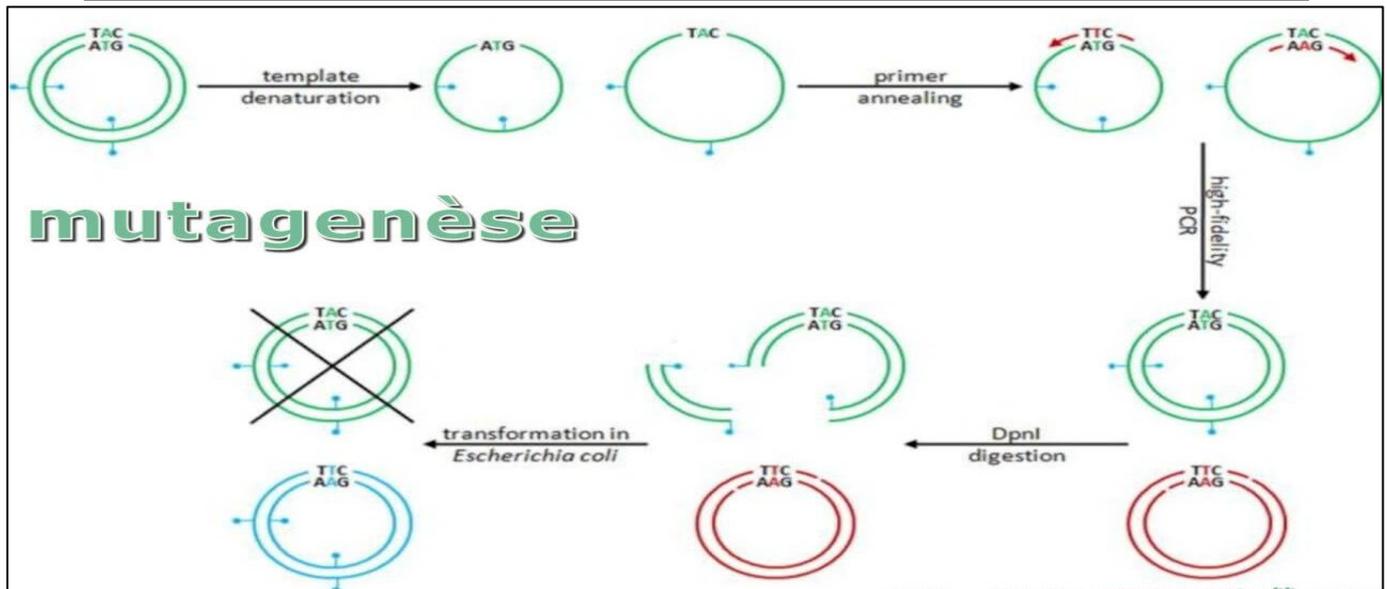


Figure 3. La mutagénèse aléatoire

Une mutation était autrefois détectée par des anomalies congénitales reproductibles (si elles n'affectent pas le système de reproduction, ou par des changements de certaines fonctions de l'organisme, génétiquement plus ou moins transmissible aux générations suivantes (caractère récessif ou non). Depuis les années 1970, des tests simplifiés ou plus précis permettent de détecter les produits mutagènes et certains de leurs effets⁷ (exemple : tests des micronoyaux)).

3.3. Les différentes méthodes

Les mutagènes induisent l'apparition de mutations par 3 mécanismes différents au moins. Ils peuvent remplacer, modifier ou endommager des parties de la séquence d'ADN.

Lors de la délétion, une partie de la séquence d'ADN est perdue ou supprimée. Lorsque le nombre de bases ajoutées ou supprimées n'est pas multiple de 3, un changement du cadre de lecture de la séquence d'ADN est provoqué.

3.3.1. Remplacement de bases

A. Incorporation d'analogues de bases :

Certains composés chimiques ressemblent suffisamment aux bases azotées pour être incorporés à leurs places dans l'ADN. Ce sont des analogues de bases qui pourront se lier à n'importe quelle base du brin complémentaire contrairement à la règle d'appariement des bases dans l'ADN. Ils peuvent donc provoquer l'insertion face à eux de nucléotides incorrects. Par exemple, le 5-bromouracile (ou 5-BU) est un analogue de la thymine et le 2-aminopurine (ou 2-AP) est un analogue de l'Adénine.

3.3.2. Modification de la séquence d'ADN

- mésappariement spécifique :

Certains mutagènes modifient une base pour qu'elle ne suive plus le principe d'appariement (A-T, G-C). Parmi ces mutagènes, on trouve des agents alkylants qui ajoutent des groupements alkyles sur les bases. D'autres agents chimiques peuvent provoquer la désamination (enlève un $-NH_2$) des bases.

- **agents intercalants** : Ce sont des molécules capables de se glisser entre les bases azotées. Elles peuvent provoquer une inhibition du procédé de réplication de l'ADN. On trouve par exemple la proflavine et l'acridine orange.
- **PCR (Réaction en chaîne par polymérase)** : On utilise une amorce mutée qui permet de provoquer, à une position précise, la mutation voulue. Le gène ainsi modifié sera ensuite cloné un grand nombre de fois grâce à la réplication de l'ADN¹⁰.
- **par « cassettes »** : On synthétise chimiquement des oligonucléotides complémentaires de façon à obtenir une petite séquence ADN double-brin appelée cassette, qui contient la mutation souhaitée. Cette cassette est ensuite insérée dans le gène cible¹¹.

3.3.3 Endommagement

Il existe un grand nombre de mutagènes qui endommagent une ou plusieurs bases, il n'y a alors plus d'appariement spécifique et cela entraîne un blocage de la réplication.

- **lumière ultraviolette** : Elle implique différentes lésions dans l'ADN. Certaines relient deux pyrimidines adjacentes sur le même brin.

4. Les agents mutagènes

Les mutations spontanées lors de la réplication sont peu nombreuses (1 erreur pour 10^{10} bases) grâce à l'activité de correction des ADN polymérase (activité exonucléasique 3' 5') qui leur permet de vérifier si la dernière base introduite est la base correcte. Il existe cependant des agents qui vont augmenter le taux d'erreurs, appelés agents mutagènes.

4.1. Les agents environnementaux

Les radiations solaires et cosmiques, les agents chimiques, les UV, les radiations alpha et gamma, les virus, les rayons X sont de nombreuses molécules ou entité qui augmentent la fréquence des dommages causés à la molécule d'ADN.

La plupart des agents cancérigènes sont aussi des agents mutagènes, c'est ainsi que Bruce Ames mis au point un test afin de déterminer le pouvoir potentiellement cancérigène de certains produits chimiques, ce test permet donc de déterminer le potentiel pouvoir mutagène de certaines molécules chimiques. Pour cela il utilise la bactérie *Salmonella typhimurium*. Le principe de cette expérience est simple, la souche bactérienne utilisée est incapable d'utiliser un acide aminé, l'histidine, pour se multiplier.

Ces bactéries possèdent en effet une mutation qui altéré la voie métabolique de synthèse de l'histidine. De manière spontanée après mise en culture sur un milieu sans histidine certaines bactéries peuvent subir une réversion de mutation (inversion de cette mutation) qui lui permet alors de grandir sur un milieu sans histidine.

Dans le cas ou dans le milieu des agents chimiques mutagènes (cancérigènes) sont ajoutés, la quantité de bactéries subissant l'inversion de la mutation est fortement augmentée. Elle est d'autant plus augmentée que l'agent est mutagène. Finalement en présence d'agents fortement mutagènes, des colonies de bactéries se développent sur des milieux sans histidine au départ.

4.2. Altération spontanée due à l'action de l'eau

L'hydrolyse agit fréquemment en modifiant les radicaux associés aux bases azotées des nucléotides. Toutes ces altérations provoquent la mise en place de bases azotées non naturelles (modifiées, tautomère) dans la molécule d'ADN et donc des paires de nucléotides non appariés.

4.3. Cas particulier des UV.

L'action de radiations comme les ultra-violets peut provoquer la fusion de deux thymine située l'une à côté de l'autre sur un brin d'ADN (on parle de dimère de thymine). Les UV peuvent également provoquer la fusion d'une Thymine et d'une cytosine située l'une à côté de

l'autre sur le brin d'ADN (on parle alors de dimère Thymine--cytosine). Dans le cas de formation de dimère, cela provoque une incapacité de ces nucléotides de se lier avec leur base complémentaire située sur le brin complémentaire de la molécule d'ADN. Cette absence d'appariements provoque l'arrêt de l'ADN polymérase lors de la réplication.

Une maladie génétique appelée **Xeroderma pigmentosum** rend les personnes affectées très sensibles à la lumière solaire et celles--ci souffrent de lésions de peau, de cancer cutané. Cette maladie est due à la mutation des gènes permettant la synthèse des protéines qui vont éliminer les dimères de thymine ou de Thymine--cytosine provoquer par l'action des UV.

4.4. Les radiations ionisantes

Les radiations ionisantes alpha et gamma provoquent le type de lésions les plus dangereuses Pour l'ADN, c'est--à--dire la cassure des deux brins de la molécule provoquant ainsi la mort de la cellule si aucun mécanisme n'intervient.

C'est cette propriété qui est utilisée pour tuer les cellules cancéreuses dans le cas d'un Cancer réactif au traitement ionisant (rayons X, gamma,...)

5. LES MECANISMES REPARATEURS DE L'ADN

Il existe plusieurs types de systèmes de réparation qui agiront sur les différents types de mutations.

3.1. Réparation des cassures de l'ADN : elle se fait grâce à l'ADN ligase.

3.2. Correction des mésappariements

Certains mésappariements produits lors de la réplication n'ont pas corrigés par l'activité de relecture de l'ADN polymérase. C'est donc le système MMR (*Mis Match Repair*) qui repère les mésappariements.

La présence d'un mauvais appariement localisé est décelée par une protéine spécifique appelée protéine MSH. La protéine MSH reconnaît des erreurs d'appariements mais aussi des insertions ou des délétions de quelques nucléotides. La protéine MLH stabilise le complexe formé entre MSH et la portion d'ADN double brin qui présente le mauvais appariement.

Un endonucléase hydrolyse le brin d'ADN en amont et en aval du mésappariement. Il ne restera qu'à une ADN polymérase d'intervenir pour combler la brèche puis à une ligase pour terminer le travail.

3.3. Réparation des dimères de thymine (système d'excision-resynthèse)

Ces dimères de thymine, produits par les rayonnements ultraviolets, vont être enlevés par un système de réparation spécifique. Il y a d'abord reconnaissance du dimère de thymine, ouverture de la double hélice par une hélicase, coupure par une endonucléase qui coupe le brin d'ADN de part et d'autre du dimère de thymine, la brèche est ensuite comblée par l'ADN polymérase en utilisant le brin intact comme matrice, enfin les extrémités sont soudées par une ADN ligase.

Ce type de mécanisme permet de réparer d'autres lésions que les dimères de thymine.

3.4. Correction d'une base anormale par excision

Des bases peuvent subir des modifications chimiques par l'action d'agents mutagènes. Des glycosylases éliminent la base modifiée, ce qui crée un site abasique (sans base) reconnu par une endonucléase AP (apurinique ou apyrimidique), ce qui retire le sucre et son groupement phosphate. Le trou ainsi constitué est bouché par un ADN polymérase, puis une ligase scelle le tout.

3.5. Réparation directe sur les bases

De même que des agents mutagènes ont pu modifier chimiquement une base, il existe des enzymes capables de retirer ces modifications et de revenir à une base normale. Ces modifications se font alors *in situ*, c'est-à-dire sur l'ADN même, sans excision ni de base, ni nucléotide.

3.6. Réparation post-répliquatives des dimères de thymine

Ces réparations se feront à l'issue de la réplication. Il en résulte que l'ADN polymérase saute le dimère de thymine pour constituer la réplication, ce qui entraîne pour le brin fils une lacune, et pour le brin parental matriciel la présence d'un dimère de thymine ; l'information génétique est donc perdue sur l'ensemble des deux brins, ce qui peut entraîner de graves conséquences pour la cellule, puisqu'il ne reste plus d'information originelle intacte. Il faut donc absolument régler ce problème avant que la cellule ne divise et que l'information ne soit définitivement perdue.

Une protéine, la protéine **RecA** (Recombinaison A), va utiliser la deuxième double hélice d'ADN intact pour reconstituer celle qui est lésée et combler la lacune sur le brin fils en face du dimère de thymine, puis le système d'excision-resynthèse pourra enlever le dimère de thymine et combler la lacune car le brin fils est redevenu normal.

6. Quels sont les effets possibles des mutations chromosomiques ?

Les anomalies chromosomiques peuvent avoir de nombreux effets différents, selon l'anomalie spécifique. Par exemple, une copie supplémentaire du chromosome 21 provoque le syndrome de Down (trisomie 21). Les anomalies chromosomiques peuvent également provoquer une fausse couche, une maladie ou des problèmes de croissance ou de développement.

7. Diagnostic génotypique

De nombreux tests génétiques apportent des informations relatives à la santé des individus ou à celle de leur famille. Ces tests consistent à rechercher des anomalies sur la molécule d'ADN elle-même, ou à dépister des anomalies concernant le nombre ou la forme des chromosomes.

Le génotypage est l'ensemble des analyses génétiques moléculaires visant à déterminer l'identité d'une variation génétique, à une position spécifique dans le génome (entier ou une partie), pour un individu ou un groupe d'individus donné appartenant à une espèce animale, végétale, fongique.

-
- Soit de manière **standardisée et automatisée** par des robots (robots de pipetage, robot extracteur d'ADN...), thermocycleurs, séquenceurs...(cas des grands programmes visant à cartographier le génome entier de certaines espèces d'intérêt médical ou économique, exemple : On estime que les différences entre deux êtres humains sont d'environ 3 millions de nucléotides sur les 3 milliards de nucléotides qui constituent leur génome)
 - Soit par d'autres techniques tel que **le génotypage microsatellite** dans des laboratoires (exemple 1 : par PCR en temps réel, il est possible de détecter si un animal est transgénique ou non, combien de copies d'un gène sont disponibles et s'il est hétérozygote ou homozygote. Exemple 2 : 1 seule puce à ADN permettrait actuellement de génotyper une région du génome bactérien pour identifier certaines espèces et de vérifier une éventuelle antibiorésistance : intérêt médical).

7.1. Les différents examens génétiques

Le principe d'un examen génétique est d'analyser le matériel génétique (ADN ou chromosomes) qui se trouve dans les cellules de la personne. Le plus souvent, l'analyse est réalisée à partir d'une prise de sang. Certaines situations particulières nécessitent un autre type de prélèvement comme par exemple de salive, de cellules de la peau ou de cellules musculaires.

Dans le cas d'un diagnostic prénatal (**DPN**), en fonction de la situation et du terme de la grossesse, l'analyse génétique du fœtus peut être réalisée à partir de :

- Un échantillon de liquide amniotique (liquide dans lequel se trouve le fœtus)
- Un échantillon de cellules du trophoblaste (futur placenta)
- Une prise de sang chez la mère (de l'ADN issu du fœtus circule en petite quantité dans le sang de la mère) Le prélèvement est transmis à un laboratoire d'analyse spécialisé. L'analyse et la méthode utilisée dépendent de l'indication.

7.1.1. Analyse des chromosomes

Si l'anomalie résulte d'un problème au niveau du **chromosome**, on parle d'anomalie chromosomique. Ce type d'anomalies peut notamment être dû à :

- La présence d'un chromosome supplémentaire sur une des paires (trisomie)
- Ou, l'absence d'un chromosome sur une des paires (monosomie)
Parfois, seulement une partie d'un chromosome est en trop ou manque.

Pour identifier ces anomalies chromosomiques, différents examens peuvent être prescrits selon l'indication parmi lesquels :

- Un caryotype
- Une analyse par FISH (Hybridation in situ par fluorescence)
- Une Analyse Chromosomique par Puce à ADN (ACPA)